

PHỤC TRÁNG VÀ NHÂN NHANH CÁC GIỐNG ĐỊA LAN *CYMBIDIUM* CV. BẰNG NUÔI CẤY ĐỈNH SINH TRƯỞNG

PHAN XUÂN HUYỀN, NGUYỄN TRUNG ÁI,
NGUYỄN THỊ LANG, NGUYỄN THỊ DIỆU HƯƠNG,
ĐINH VĂN KHIÊM, DƯƠNG TẤN NHỰT

Phân viện Sinh học tại Đà Lạt

Cymbidium là một chi của họ Lan (Orchidaceae), đây là những giống hoa đặc thù của thành phố Đà Lạt, hoa đẹp được mọi người ưa thích và có giá trị kinh tế cao. Hiện nay, nguồn địa lan *Cymbidium* trồng tại Đà Lạt ngày càng cạn kiệt dần do hàng năm một số lượng lớn chậu địa lan *Cymbidium* được chuyển đến các thành phố lớn trong nước; cây bị thoái hóa trong quá trình nuôi trồng và nhân giống vô tính ngoài vườn ươm [1, 2, 3].

Bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật có thể phục tráng khả năng sinh trưởng trở lại bình thường của các giống bị nhiễm bệnh qua nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, đồng thời nhân nhanh một số lượng lớn cây giống trong thời gian ngắn, đáp ứng theo mùa vụ [2, 4, 5, 6].

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Một số giống địa lan *Cymbidium* có giá trị kinh tế cao như: Tím hạt, Xanh miretta, Trắng bà rịa, Xanh chiếu, Xanh thơm, Xanh nandy, Tím nghĩa và Vàng ba râu. Chọn những cây bố mẹ sinh trưởng tốt, cho hoa đẹp, tiến hành thu chồi non để đưa vào nuôi cấy.

2. Phương pháp

a) Khử trùng mẫu

Những chồi non có chiều dài từ 3-5 cm được khử trùng bằng cồn 70° trong 30 giây, sau đó khử trùng bằng dung dịch 10% hypochlorit canxi (CaOCl₂) và vài giọt tween 80 trong 20 phút. Rửa kỹ lại vài lần bằng nước cất vô trùng. Tách lấy đỉnh sinh trưởng và đặt chúng trong môi trường nuôi cấy.

b) Tạo protocorm-like body (PLB) từ đỉnh sinh

trưởng

Đỉnh sinh trưởng sau khi tách được nuôi cấy trên môi trường MS gồm khoáng đa lượng, vi lượng, vitamin (Murashige and Skoog, 1962) [3] có bổ sung theo tỷ lệ 6-benzyladenin (BA) / axit α -naphthaleneacetic (NAA) là 0,5/0,2 mg/l, 30 g/l đường sucroza, 15% nước dừa tươi, 1 g/l than hoạt tính, 8 g/l agar, độ pH = 5,8. Đỉnh sinh trưởng hình thành những PLB sau 6 đến 8 tuần nuôi cấy.

c) Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường MS [3] có bổ sung 30 g/l đường sucroza, 15% nước dừa tươi, 1 g/l than hoạt tính, 8 g/l agar, độ pH là 5,8, dùng đục lập hoặc phối hợp với 0,2-3,0 mg/l BA và 0,2-1,5 mg/l NAA. Môi trường nuôi cấy được chứa trong các bình tam giác được đậy kín bằng nút cao su.

Mẫu được nuôi cấy trong điều kiện ánh sáng là 10 giờ/ngày, cường độ ánh sáng là 1500-2000 lux, nhiệt độ từ 25-27°C. Các chồi non thu được sau 6 tuần nuôi cấy. Giá thể trồng cây con là dớn sợi, dớn cây băm nhỏ. Nhà ươm trồng cây phải có lưới che ánh sáng 50% và 70%.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng phối hợp giữa BA và NAA đến sự hình thành PLB

Việc phối hợp các nồng độ BA và NAA được bố trí bằng các nghiệm thức như bảng 1. Mỗi nghiệm thức được cấy 15 PLB có kích thước tương tự nhau, các PLB này cấy làm 2, đặt trong môi trường. Qua 6 tuần nuôi cấy thu được kết quả như sau: sau 2 tuần nuôi cấy, đầu tiên, ở tất cả các nghiệm thức xuất hiện những khối tế bào có màu xanh nhạt từ mặt cắt của PLB. Tuy

nhiên, ở những nghiệm thức khác nhau, các khối tế bào hình thành và sinh trưởng cũng khác nhau. Đến tuần thứ 4, khối tế bào này tạo thành PLB và xuất hiện chồi non. Đến tuần thứ 6, các

chồi non tăng trưởng nhanh đạt chiều cao từ 0,5-3,0 cm. Đặc biệt, ở nghiệm thức 6 cho PLB lớn hơn, chồi cây sinh trưởng tốt thích hợp cho giai đoạn nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 1

Ảnh hưởng phối hợp giữa BA và NAA đến sự hình thành PLB

STT NT	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Trong lượng tươi PLB (mg)	Phát triển của PLB
1	0,0	0,0	86,8	PLB lớn, xanh mướt, chồi cây phát triển mạnh hơn
2	0,2	0,2	197,6	
3	0,5	0,2	215,2	
4	1,0	0,2	223,8	
5	1,5	0,2	244,1	
6	2,0	0,2	266,1	
7	2,5	0,2	233,0	
8	3,0	0,2	201,7	
9	0,2	0,5	219,6	PLB nhỏ, nhiều hơn, chồi cây phát triển yếu hơn
10	0,5	0,5	220,0	
11	1,0	0,5	229,0	
12	1,5	0,5	243,0	
13	2,0	0,5	265,4	
14	2,5	0,5	267,7	
15	3,0	0,5	269,8	PLB nhỏ, nhiều, chồi cây phát triển yếu hơn
16	0,2	1,0	209,6	
17	0,5	1,0	213,0	
18	1,0	1,0	222,7	
19	1,5	1,0	235,0	
20	2,0	1,0	246,0	
21	2,5	1,0	259,2	
22	3,0	1,0	265,0	

2. Ảnh hưởng của cách cắt mẫu đến quá trình hình thành PLB

Chọn 15 PLB có kích thước tương tự, tiến hành cắt theo 3 cách: thứ nhất cắt dọc làm 2 theo chiều gốc ngọn; thứ 2 cắt dọc làm 4 theo chiều gốc ngọn và thứ 3 cắt ngang làm 2 theo chiều gốc ngọn.

Tất cả các mẫu cắt được nuôi cấy trong cùng

một môi trường là nghiệm thức 6 của thí nghiệm 1 (0,2 mg/l NAA + 2,0 mg/l BA).

Quá trình phát sinh PLB cũng giống như thí nghiệm 1. Đến tuần thứ 4, hình thành PLB và nhú lên chồi cây, tuy nhiên ở các nghiệm thức khác nhau, PLB hình thành và phát triển cũng khác nhau. Nghiệm thức 2 cắt dọc làm 4 tạo nhiều PLB hơn và có trọng lượng tươi cao nhất.

Ảnh hưởng của cách cắt mẫu đến quá trình hình thành PLB

STT NT	Cách cắt mẫu	Chất sinh trưởng (mg/l)		Trọng lượng tươi PLB (mg)
		BA	NAA	
1	Cắt dọc làm 2, theo chiều gốc ngọn	2,0	0,2	267,3
2	Cắt dọc làm 4, theo chiều gốc ngọn	2,0	0,2	359,2
3	Cắt ngang làm 2, theo chiều gốc ngọn	2,0	0,2	259,0

Đã có nhiều nghiên cứu về nhân giống địa lan *Cymbidium* qua nuôi cấy PLB nhưng các tác giả thông thường chỉ cắt ngẫu nhiên theo các cách sau: cắt dọc làm 2 PLB theo chiều gốc ngọn, cắt ngang làm 2 PLB theo chiều gốc ngọn hoặc để nguyên PLB dùng làm nguyên liệu để nhân nhanh [2-6]. PLB sẽ hình thành trong quá trình nuôi cấy nhưng số lượng và trọng lượng tươi của PLB trong các trường hợp nêu trên thấp hơn số lượng và trọng lượng tươi của PLB với

phương pháp cắt làm 4 PLB theo chiều gốc ngọn (bảng 2).

3. Ảnh hưởng của NAA đến quá trình tạo rễ của chồi cây

Chồi cây phát triển từ PLB, sau đó tiến hành chọn những chồi đạt 3 lá có chiều cao tương đương nhau đem cấy trong môi trường được bố trí bằng các nghiệm thức như bảng 3. Mỗi nghiệm thức cấy 15 chồi, qua 6 tuần nuôi cấy thu được kết quả như sau:

Bảng 3

Ảnh hưởng của NAA đến quá trình tạo rễ của chồi cây

STT NT	NAA (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Sinh trưởng của cây
1	0,0	60	Cây sinh trưởng bình thường
2	0,5	100	Cây sinh trưởng tốt hơn
3	1,0	100	Cây sinh trưởng chậm
4	1,5	70	Cây sinh trưởng chậm

Sau khi cấy 2 tuần, một số chồi cây bắt đầu nhú rễ, đặc biệt ở nghiệm thức 2 và 3 xuất hiện nhiều rễ hơn. Đến tuần thứ 4, ở nghiệm thức 2 và 3 ra rễ 100%, ở nghiệm thức 1 và 4 một số cây chưa xuất hiện rễ. Chồi cây cũng tăng trưởng theo chiều cao.

Đến tuần thứ 6, ở nghiệm thức 1, tỷ lệ ra rễ 60% và cây sinh trưởng bình thường. Ở nghiệm thức thứ 4 sử dụng nồng độ NAA cao, tỷ lệ ra rễ đạt 70% và cây bị ức chế tăng trưởng chiều cao.

Ở các nghiệm thức trên, chồi cây đều có tăng trưởng về chiều cao, tuy nhiên ở các nghiệm thức khác nhau, sự tăng trưởng chiều

cao cũng khác nhau. Ở nghiệm thức 2, cây ra rễ đạt 100% và sinh trưởng tốt hơn, thuận lợi cho giai đoạn vườn ươm.

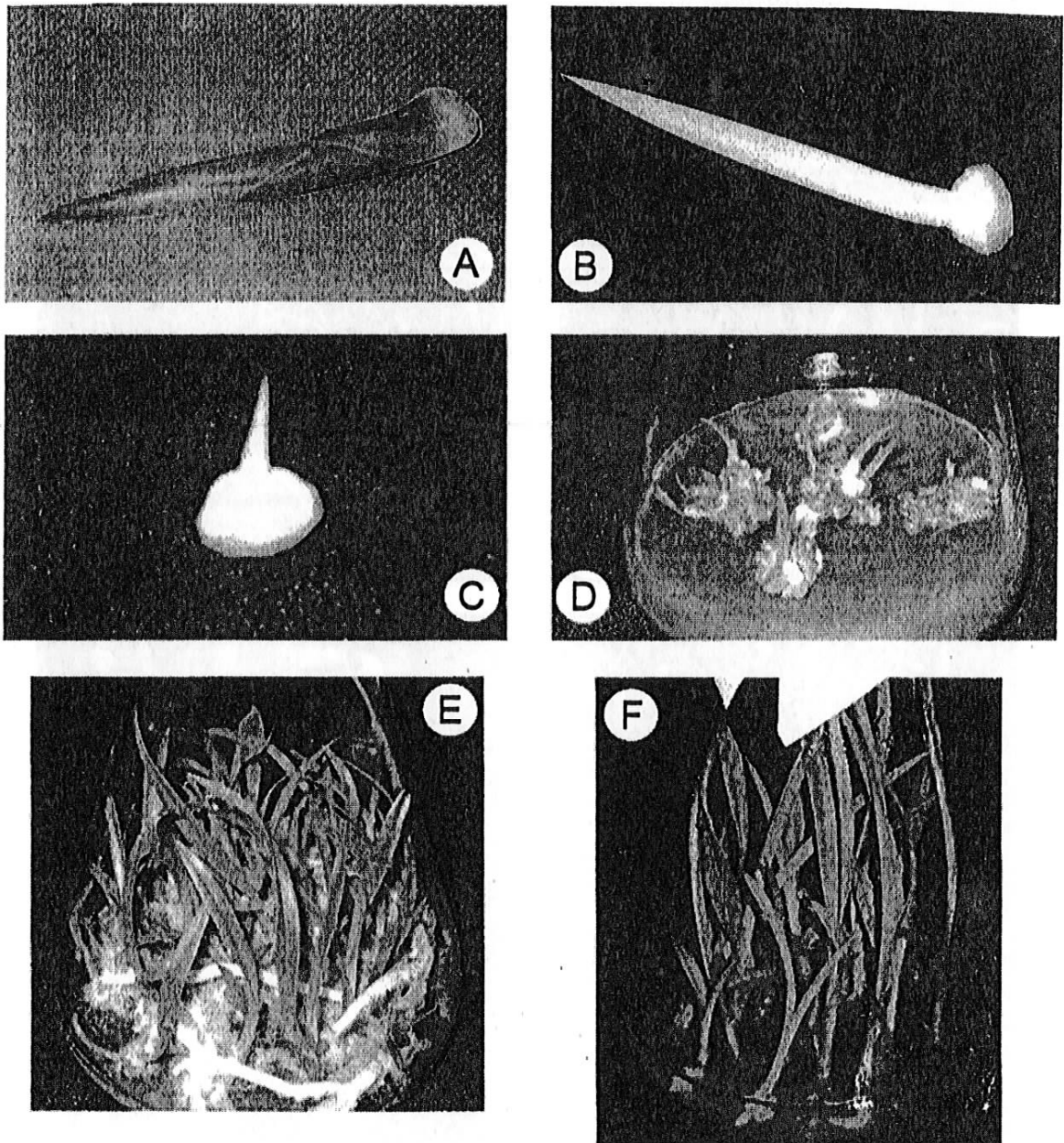
4. Trồng địa lan *Cymbidium* sau ống nghiệm

a) Giai đoạn trồng vào khay mạ

Giá thể: dùng dớn sợi xé nhỏ, trải đều vào khay nhựa.

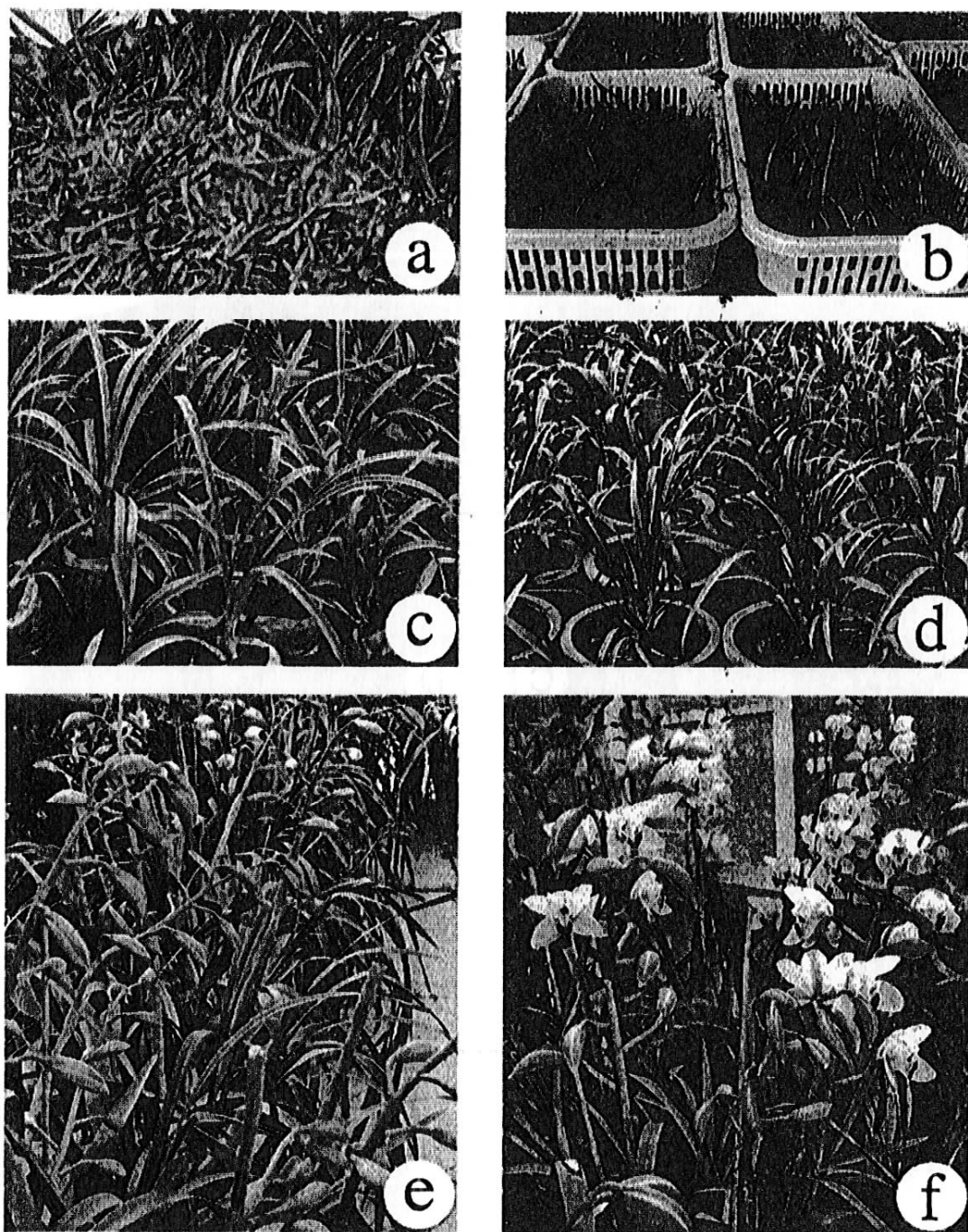
Cây con: cây địa lan mô được chuyển từ ống nghiệm ra vườn ươm có chiều cao từ 5-7 cm và đã được xử lý qua dung dịch thuốc chống nấm Zineb ở nồng độ 2‰ trong 5 phút.

Trồng vào khay: chọn các cây lan mô có



Hình 1. Phương pháp lấy mẫu và nuôi cấy *in vitro* cây địa lan *Cymbidium*

- A. chồi non tách từ cây mẹ ngoài vườn ươm
- B. chồi non tách sơ bộ các lớp lá bao ngoài trước khi khử trùng
- C. tách đỉnh sinh trưởng dưới kính lúp trong điều kiện vô trùng
- D. protocorm và chồi non hình thành sau 6-8 tuần nuôi cấy
- E. chồi non phát triển sau 6 tuần nuôi cấy có 2-3 lá, cao khoảng 4 cm
- F. chồi non hình thành rễ sau 6 tuần nuôi cấy.



Hình 2. Giai đoạn ra mạ, trồng và chăm sóc ngoài vườn ươm

- A. cây mô sau khi lấy ra ngoài ống nghiệm
- B. cây mô trồng vào khay, ở giai đoạn 3 tháng tuổi
- C. cây mô chuyển từ khay mạ ra bịch ni lông, ở giai đoạn 1 năm tuổi
- D. cây mô chuyển từ bịch ni lông ra chậu, ở giai đoạn 3 năm tuổi
- E và F. cây địa lan *Cymbidium* mô ra nụ và hoa, cây ở giai đoạn 4 năm tuổi.

kích thước tương đương vào cùng một khay; đặt cây đứng thẳng, bộ rễ không được chồng lên nhau, phủ dớn ngang cổ rễ.

Chăm sóc: đặt khay lan mô nơi thông thoáng, tránh mưa, gió, ánh sáng trực tiếp dưới 30%, tưới nước bằng vòi phun sương, không để giá thể quá ướt hoặc quá khô. Sử dụng phân bón qua lá hàng tuần, phun phòng ngừa thuốc sâu bệnh 1 tuần 1 lần. Sau khi trồng 3 tuần, cây lan mô bắt đầu đâm rễ mới hoặc mọc thêm từ rễ cũ. Tỷ lệ cây sống đạt 95%. Sau 3 tháng, khi rễ dài 3-5 cm, cây được chuyển sang trồng riêng. Nhìn chung, ở giai đoạn này, cây lan mô tăng trưởng rất chậm.

b) Giai đoạn trồng riêng

Từ 3 tháng đến 1 năm: chuyển cây vào bịch nilông có đường kính từ 10-15 cm với giá thể là dớn sợi xé nhỏ. Ánh sáng trực tiếp 30%. Tưới nước, phân bón qua lá và thuốc phòng chống sâu bệnh như giai đoạn trên.

Từ 1 năm đến 2 năm: chuyển cây sang chậu có đường kính 25-30 cm hoặc dùng bịch nilông 20-30 cm với giá thể gồm hỗn hợp 1/2 dớn sợi + 1/2 dớn cây có phối trộn phân chuồng và NPK. Ánh sáng trực tiếp 50%. Phun phân qua lá và thuốc phòng chống sâu bệnh như giai đoạn trên, ngoài ra, còn phun thêm phân nitrophoska (2g/l). Ở giai đoạn trồng riêng, cây sinh trưởng và phát triển tốt, dễ nhánh mạnh và kháng bệnh tốt. Cây lan mô bước sang năm thứ 3 có thể xuất hiện bông búi, đến năm thứ 4 có 60% cây lan mô ra hoa, từ năm thứ 5 trở đi ra hoa 100%.

c) So sánh cây đã được phục tráng sau 4-5 năm tuổi

Sau 4-5 năm theo dõi cây địa lan *Cymbidium* mô sản xuất bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng tại các vườn trồng địa lan tại Đà Lạt, chúng tôi thấy rằng cây địa lan *Cymbidium* sinh trưởng rất tốt, ra hoa đồng loạt, không thấy các hiện tượng bị bệnh thối đen do nấm *Phytophthora*, bệnh đốm vòng, bệnh đốm vàng do nấm *Cercospora*, bệnh thối mềm do vi khuẩn *Frwinia carotovora*, hay bệnh khảm lá và bệnh cần cây do virus gây ra. Do vậy, phương pháp

nuôi cấy đỉnh sinh trưởng có tác dụng rất hiệu quả trong việc phục tráng các giống địa lan *Cymbidium*.

III. KẾT LUẬN

1. Môi trường nuôi cấy có bổ sung chất kích thích sinh trưởng gồm 0,2 mg/l NAA và 2,0 mg/l BA thích hợp cho quá trình nhân nhanh PLB.

2. Qua các kỹ thuật cắt PLB thì cách cắt làm 4 theo chiều gốc ngọn tạo nhiều PLB nhất.

3. Môi trường có bổ sung 0,5 mg/l NAA thích hợp cho việc tạo rễ *in vitro* cây địa lan *Cymbidium*.

4. Cây địa lan mô sau khi xử lý bằng thuốc nấm Zineb 2‰, được trồng vào khay dớn, ánh sáng trực tiếp dưới 30% với chế độ tưới nước và phun dinh dưỡng qua lá thích hợp, có tỷ lệ sống đạt 95%.

5. Cây con sau khi chuyển sang chậu lớn với giá thể là hỗn hợp 1/2 dớn sợi + 1/2 dớn cây, có phối trộn phân chuồng, ánh sáng trực tiếp 50%, phun thuốc bảo vệ thực vật theo định kỳ thì cây sinh trưởng và phát triển tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ban Khoa học kỹ thuật Đà Lạt và Trạm nuôi cấy mô, 1988: Đà Lạt *Cymbidium*.
2. Dương Tấn Nhựt, Đỗ Thị Tâm, 1996: Tạp chí Sinh học, 18(1): 40-42.
3. Nguyễn Văn Uyển và cs., 1984: Nuôi cấy mô tế bào thực vật phục vụ công tác giống cây trồng.
4. Ammirato P. V. et al., 1984: Handbook of plant cell culture, 1.
5. Ammirato P. V. et al., 1984: Handbook of plant cell culture, 2.
6. Ammirato P. V. et al., 1984: Handbook of plant cell culture, 3.
7. Trần Hợp, 1989: Phong lan Việt Nam.
8. Vũ Văn Vụ, 1999: Sinh lý thực vật ứng dụng.

DISEASE-FREE PLANT PRODUCTION AND RAPID PROPAGATION OF SOME *CYMBIDIUM* CULTIVARS BY MERISTEM CULTURE

PHAN XUAN HUYEN, NGUYEN TRUNG AI, NGUYEN THI LANG,
NGUYEN THI DIEU HUONG, DINH VAN KHIEM, DUONG TAN NHUT

SUMMARY

In this paper, the protocol for disease-free plant production and rapid propagation of some *Cymbidium* cultivars by meristem culture are presented.

- Proliferation and multiplication rate of PLB were promoted in MS medium supplemented with 0.2 mg/l NAA and 2.0 mg/l BA.

- To increase the multiplication rate, PLB was cut in to 4 parts for subculture. This cutting way was better as compared to that of 2 parts.

- Shoots were well rooted on MS medium plus 0.5 mg/l NAA.

- 100% survival rate of *Cymbidium* plantlets was obtained after transferring to the greenhouse.

This protocol can be applied for the micropropagation of many *Cymbidium* cultivars with great number and uniform plantlets.

Ngày nhận bài: 22-4-2003